



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

|   |           |   |
|---|-----------|---|
| <b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b><br><b>C12N 15/60, C12P 9/88, C12N 1/19,</b><br><b>C12P 13/00</b>   | <b>A2</b> | <b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/03204</b><br><br><b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 30. Januar 1997 (30.01.97)   |
| <b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP96/03010<br><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 10. Juli 1996 (10.07.96)<br><br><b>(30) Prioritätsdaten:</b><br>A 1182/95                      12. Juli 1995 (12.07.95)                      AT<br><br><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> DSM CHEMIE LINZ GMBH [AT/AT]; St. Peter-Strasse 25, A-4021 Linz (AT).<br><br><b>(72) Erfinder; und</b><br><b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> HASSLACHER, Meinhard [AT/AT]; Münzgrabenstrasse 45, A-8010 Graz (AT). SCHALL, Michael [AT/AT]; Feuerbachgasse 19, A-8020 Graz (AT). SCHWAB, Helmut [AT/AT]; Mariagrünnerstrasse 93, A-8043 Graz (AT). HAYN, Elfriede, Marianne [AT/AT]; Strauchergasse 24, A-8020 Graz (AT). KOHLWEIN, Sepp [-/AT]; Camerigasse 12/42, A-8010 Graz (AT). GRIENGL, Herfried [-/AT]; Argenotstrasse 23, A-8047 Graz (AT).<br><br><b>(74) Anwalt:</b> KUNZ, Ekkehard; Agrolinz Melamin GmbH, Patentabteilung, St. Peter-Strasse 25, A-4021 Linz (AT). |           | <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> CA, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br><b>Veröffentlicht</b><br><i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i> |
| <b>(54) Title:</b> (S)-HYDROXYNITRILLYASE FROM HEVEA BRASILIENSIS<br><br><b>(54) Bezeichnung:</b> (S)-HYDROXYNITRILLYASE AUS HEVEA BRASILIENSIS<br><br><b>(57) Abstract</b><br><p>(S)-hydroxynitrillyase from <i>Hevea brasiliensis</i> in a purified and isolated form is disclosed, as well as the DNA sequence that codes for this enzyme, its amino acid sequence and a process for producing a protein with (S)-hydroxynitrillyase activity.</p><br><b>(57) Zusammenfassung</b><br><p>(S)-Hydroxynitrillyase aus <i>Hevea brasiliensis</i> in gereinigter und isolierter Form, DNA-Sequenz, die für dieses Enzym kodiert, sowie seine Aminosäuresequenz und Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit (S)-Hydroxynitrillyase-Aktivität.</p>   |           |   |

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                                |    |                                   |    |                                |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AM | Armenien                       | GB | Vereinigtes Königreich            | MX | Mexiko                         |
| AT | Österreich                     | GE | Georgien                          | NE | Niger                          |
| AU | Australien                     | GN | Guinea                            | NL | Niederlande                    |
| BB | Barbados                       | GR | Griechenland                      | NO | Norwegen                       |
| BE | Belgien                        | HU | Ungarn                            | NZ | Neuseeland                     |
| BF | Burkina Faso                   | IE | Irland                            | PL | Polen                          |
| BG | Bulgarien                      | IT | Italien                           | PT | Portugal                       |
| BJ | Benin                          | JP | Japan                             | RO | Rumänien                       |
| BR | Brasilien                      | KE | Kenya                             | RU | Russische Föderation           |
| BY | Belarus                        | KG | Kirgisistan                       | SD | Sudan                          |
| CA | Kanada                         | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden                       |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KR | Republik Korea                    | SG | Singapur                       |
| CG | Kongo                          | KZ | Kasachstan                        | SI | Slowenien                      |
| CH | Schweiz                        | LI | Liechtenstein                     | SK | Slowakei                       |
| CI | Côte d'Ivoire                  | LK | Sri Lanka                         | SN | Senegal                        |
| CM | Kamerun                        | LR | Liberia                           | SZ | Swasiland                      |
| CN | China                          | LK | Litauen                           | TD | Tschad                         |
| CS | Tschechoslowakei               | LU | Luxemburg                         | TG | Togo                           |
| CZ | Tschechische Republik          | LV | Lettland                          | TJ | Tadschikistan                  |
| DE | Deutschland                    | MC | Monaco                            | TT | Trinidad und Tobago            |
| DK | Dänemark                       | MD | Republik Moldau                   | UA | Ukraine                        |
| EE | Estland                        | MG | Madagaskar                        | UG | Uganda                         |
| ES | Spanien                        | ML | Mali                              | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| FI | Finnland                       | MN | Mongolei                          | UZ | Usbekistan                     |
| FR | Frankreich                     | MR | Mauretanien                       | VN | Vietnam                        |
| GA | Gabon                          | MW | Malawi                            |    |                                |

### (S)-Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis*

Die Durchführung chemischer Reaktionen unter Zuhilfenahme biologischer Katalysatoren erlangt zunehmend Bedeutung, vor allem in solchen Anwendungsbereichen, in denen die bei Enzymen häufig ausgeprägte Eigenschaft, bei Reaktionen mit chiralen oder prochiralen Komponenten bevorzugt eines der beiden Enantiomeren umzusetzen, genutzt werden kann.

Eines der verwendeten Enzyme ist die (S)-Hydroxynitrillyase (Hnl) aus *Hevea brasiliensis*, welche neben der Bildung aromatischer auch die Bildung aliphatischer (S)-Cyanhydrine aus den entsprechenden Aldehyden beziehungsweise Ketonen mit HCN oder HCN-Donoren katalysiert (EP-A-O 632 130). Dies ist insofern von Bedeutung, als mit anderen (S)-Hydroxynitrillyasen, wie beispielsweise jener aus *Sorghum bicolor* keine aliphatischen (S)-Cyanhydrine hergestellt werden können (Tetrahedron Letters, 31: 1249-1252, 1990).

Die bisher bekannte Hnl wird aus den Blättern der *Hevea brasiliensis* gemäß Selmar (Physiologia plantarum 75: 97-101, 1989) hergestellt und weist eine molekulare Masse von 46 kDa auf (J.E. Poulton in: Cyanide Compounds in Biology [Ciba Foundation Symposium 140], pp 67-91, 1988). Allerdings ist das so isolierte Enzym nicht rein genug, um spezifische Anti-Hnl Antikörper zu gewinnen oder Aminosäuresequenzen des Hnl Proteins zu ermitteln. Alle Versuche, reines HNL-Enzym mittels anderer üblicher chromatographischer Reinigungsschritte zu isolieren, schlugen fehl. Es konnte bei allen Versuchen, das Enzym mittels Ionenaustausch-Chromatographie durch Natriumchlorid-Gradienten-Elution in reiner Form zu gewinnen keine Hnl-Aktivität im Säuleneluat gefunden werden. Dies gelang erst, nachdem anstelle des sonst üblichen Natriumchlorid-Gradienten Ammoniumsulfat zur Elution verwendet wurde. Gegenstand der Erfindung ist demnach eine (S)-Hydroxynitrillyase in gereinigter und isolierter Form.

Die so isolierte und gereinigte Hnl besitzt eine molekulare Masse von  $30 \pm 1$  kDa, eine spezifische Aktivität von 19 IU/mg Protein und beinhaltet folgende Aminosäure-Teilsequenzen:

Teilsequenz 1: ...-leu-met-glu-val-phe-pro-...

Teilsequenz 2: ...-gly-ser-leu-phe-gln-asn-...

Teilsequenz 3: ...-glu-ile-ala-glu-ile-leu-gln-glu-val-ala

- 2 -

Dadurch war es in weiterer Folge möglich, nach reverser Transkription von mRNA aus *Hevea brasiliensis* eine cDNA Kopie des *hnl*-Gens zu klonieren, die folgende Nukleotidsequenz aufweist, wobei die davon für das Hnl Protein abgeleitete Aminosäuresequenz darunter angegeben ist und die aus dem Hnl Protein ermittelten Teilsequenzen durch unterstreichen gekennzeichnet sind.

(-43)G AAG AGC ACA TAT CGA TAG TAA AGA GTA AGA TAT CAT CAG AAA

|         |  |         |  |
|---------|--|---------|--|
| 1/1     | ATG GCA TTC GCT CAT TTT GTT CTT ATT CAT                    | 31/11   | ACC ATA TGC CAC GGT GCA TGG ATT TGG CAC        |
|         | Met ala phe ala his phe val leu ile his                    |         | thr ile cys his gly ala trp ile trp his        |
| 61/21   | AAG CTC AAA CCC CTC CTT GAG GCA CTT GGC                    | 91/31   | CAC AAG GTT ACT GCA CTG GAC CTT GCA GCA        |
|         | lys leu lys pro leu leu glu ala leu gly                    |         | his lys val thr ala leu asp leu ala ala        |
| 121/41  | AGC GGC GTT GAC CCA AGG CAA ATT GAG GAG                    | 151/51  | ATT GGC TCA TTT GAT GAG TAT TCT GAA CCC        |
|         | ser gly val asp pro arg gln ile glu glu                    |         | ile gly ser phe asp glu tyr ser glu pro        |
| 181/61  | TTG TTG ACG TTC TTG GAG GCA CTC CCT CCA                    | 211/71  | GGG GAA AAG GTG ATT CTG GTT GGC GAG AGC        |
|         | leu leu thr phe leu glu ala leu pro pro                    |         | gly glu lys val ile leu val gly glu ser        |
| 241/81  | TGT GGA GGA CTC AAT ATA GCA ATT GCT GCT                    | 271/91  | GAT AAA TAC TGT GAA AAG ATT GCA GCT GCT        |
|         | cys gly gly leu asn ile ala ile ala ala                    |         | asp lys tyr cys glu lys ile ala ala ala        |
| 301/101 | GTT TTC CAC AAT TCA GTA TTG CCA GAC ACC                    | 331/111 | GAG CAC TGC CCA TCT TAC GTC GTG GAT AAG        |
|         | val phe his asn ser val leu pro asp thr                    |         | glu his cys pro ser tyr val val asp lys        |
| 361/121 | CTC ATG GAG GTG TTT CCC GAC TGG AAA GAC                    | 391/131 | ACC ACG TAT TTT ACG TAC ACT AAA GAT GGC        |
|         | <u>leu met glu val phe pro</u> asp trp lys asp             |         | thr thr tyr phe thr tyr thr lys asp gly        |
| 421/141 | AAG GAG ATA ACT GGA TTG AAA CTG GGC TTC                    | 451/151 | ACG CTT CTG AGG GAA AAT TTA TAT ACC CTT        |
|         | lys glu ile thr gly leu lys leu gly phe                    |         | thr leu leu arg glu asn leu tyr thr leu        |
| 481/161 | TGC GGT CCT GAG GAA TAT GAA CTG GCG AAG                    | 511/171 | ATG TTG ACA AGG AAG GGA TCA TTA TTT CAA        |
|         | cys gly pro glu glu tyr glu leu ala lys                    |         | met leu thr arg lys <u>gly ser leu phe gln</u> |
| 541/181 | AAT ATT TTA GCT AAG CGA CCA TTC TTC ACT                    | 571/191 | AAG GAA GGT TAC GGA TCG ATT AAG AAA ATT        |
|         | <u>asn</u> ile leu ala lys arg pro phe phe thr             |         | lys glu gly tyr gly ser ile lys lys ile        |
| 601/201 | TAT GTG TGG ACC GAC CAA GAC GAA ATA TTT                    | 631/211 | TTA CCT GAA TTT CAA CTC TGG CAA ATA GAA        |
|         | tyr val trp thr asp gln asp glu ile phe                    |         | leu pro glu phe gln leu trp gln ile glu        |
| 661/221 | AAC TAT AAA CCA GAC AAG GTT TAT AAG GTC                    | 691/231 | GAA GGT GGA GAT CAT AAA TTG CAG CTT ACA        |
|         | asn tyr lys pro asp lys val tyr lys val                    |         | glu gly gly asp his lys leu gln leu thr        |
| 721/241 | AAG ACT AAG GAG ATC GCT GAA ATT CTC CAA                    | 751/251 | GAG GTG GCT GAT ACC TAT AAT TGA CTT CTT        |
|         | lys thr lys <u>glu ile ala glu ile leu gln</u> glu val ala |         | asp thr tyr asn OPA                            |

- 3 -

TGAGGCTTTTGTACTATTAAAGTATGGGAGCAACTATGAGTTAATAATCTCACATTTTCAAGTGGGAATTAAGTTGTG  
CTAAAATAAAGTTGTTTATTGTGTTGTAATTTTTTTTTTCATTGAAGTGGGACAGTCTCGCACGCTTTCGAGACTCTTT  
ATTTATATATATAATGTAAGTGTGTATTTAAGGGAAAGCTACCCCTATTGTGTAGCTTATCATGCTTTTCTTTGAATCA  
AATAAATAAACTTATTT

Die cDNA enthält den gesamten kodierenden Bereich des *hnl*-Gens mit einem offenen Leserahmen für ein Polypeptid von 257 Aminosäuren. Die molekulare Masse wurde aus der von der ermittelten DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz des kodierenden Proteins mit 29.227 Da errechnet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist demnach eine DNA-Sequenz, die für (S)-Hydroxynitrillyase kodiert oder mit dieser Sequenz im für Hydroxynitrillyase kodierenden Bereich zu über 85 % identisch ist. Sie wurde durch reverse Transkription aus mRNA gewonnen. Die cDNA stellt die Basis für die Gewinnung von Enzympräparationen durch heterologe Expression in verschiedenen Wirtsorganismen dar.

Die vorliegende Erfindung betrifft demnach weiters rekombinante Proteine, herstellbar durch heterologe Expression des *hnl*-Gens (cDNA) aus *Hevea brasiliensis* in geeigneten Mikroorganismen, vorzugsweise in eukaryotischen Mikroorganismen.

Es hat sich insbesondere gezeigt, daß sich rekombinantes Hnl Protein, das durch heterologe Expression des *Hevea brasiliensis hnl*-Gens (cDNA) in eukaryotischen Mikroorganismen, wie etwa in *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* hergestellt wurde, deutlich vom natürlichen, aus der Pflanze *Hevea brasiliensis* isolierten Hnl Protein unterscheidet. Das wesentliche Charakteristikum ist, daß die spezifische Aktivität von solchem rekombinanten Hnl Protein deutlich höher ist als die spezifische Aktivität des gereinigten natürlichen Proteins aus *Hevea brasiliensis*. Die Unterschiede manifestieren sich auch im elektrophoretischen Verhalten der Proteine. Sowohl bei der isoelektrischen Fokussierung als auch bei Trennung in nativen Polyacrylamid Gelen werden die Proteinbanden von gereinigten rekombinanten und natürlichen Hnl Proteinen bei unterschiedlichen Positionen aufgefunden. Es wird angenommen, daß dieses unterschiedliche Verhalten auf in der Pflanze und in den Mikroorganismen nicht ident ablaufende post-translationale Modifikationsprozesse zurückzuführen ist und daß die höhere spezifische Aktivität des rekombinanten Hnl Proteins auf in eukaryotischen Mikroorganismen anders modifizierte Proteinmoleküle zurückzuführen ist.

## Beispiel 1

### Gewinnung von reinem Hnl Protein aus *Hevea brasiliensis*

Portionsweise wurden je 8 g Blätter von *Hevea brasiliensis* (gelagert bei -20 °C in 80 ml 20 mM Kaliumphosphat -Puffer pH 6.5 mit einem Omnimixer (10000 U/min, 1.5 min) unter Eiskühlung homogenisiert. Der erhaltene Extrakt wurde 1 Stunde bei 4 °C gehalten und danach zum Abtrennen der groben Zellbestandteile durch Damen-Nylon-Strümpfe filtriert. Das Retentat wurde nochmals mit 20 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6.5 gewaschen. Kleine Partikeln wurden durch Zentrifugation (40 min, 18000 Upm) entfernt. Dieser so erhaltene Proteinrohextrakt wurde in folgender Sequenz chromatographisch gereinigt:

#### Ionenaustauschchromatographie

Eine QAE-Sepharose F.F. Säule (XK 16, 21 cm, Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde mit Startpuffer I (10 mM Histidin-Schwefelsäure pH 6.5, 10 % Sorbit) äquilibriert. Nach der Probenauftragung wurde die Säule mit mindestens 50 ml Start-Puffer gewaschen. Zur Elution wurde ein linearer Gradient von 0 bis 0.6 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in Startpuffer I verwendet. Fraktionen (10 ml) wurden gesammelt und auf Hnl Aktivität getestet, und Fraktionen mit Hnl Aktivität gepoolt.

#### Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie

Eine Säule (XK 26, 11 cm), gepackt mit Phenyl-Sepharose low substitution, (Pharmacia) wurde mit Startpuffer H (0.65 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in 0.1 M Kaliumphosphat-Puffer pH 6.0) äquilibriert. Die vereinigten Hnl Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie wurden auf 25 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  Sättigung eingestellt und aufgetragen. Dann wurde die Säule mit 200 ml Start-Puffer gewaschen und anschließend mit einem fallenden linearen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  Gradienten (in 0.1 M Kaliumphosphat, pH 6.0) eluiert. 10 ml Fraktionen wurden gesammelt, auf Hnl Aktivität getestet, und Fraktionen mit Hnl Aktivität gepoolt.

#### Ausschlußchromatographie

Eine Biogel P150 Säule (26 x 34 cm, Biorad, Hercules, California) wurde mit 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6.5 äquilibriert. Das Volumen der Enzymlösung wurde vor dem Auftragen durch Ultrafiltration (Ausschlußgrenze 10000 Da, Amicon Inc., Beverly, MA) reduziert. Die Elution erfolgte mit 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6.5 bei Raumtemperatur, Fraktionen (6 ml) wurden gesammelt. Das so gereinigte Hnl Protein zeigte in der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese nur mehr eine einzige Bande bei einem Molekulargewicht von  $30 \pm 1$  kDa und hatte eine spezifische Aktivität von 19 IU/mg.

### Test auf Hnl Aktivität

Die Hnl-Enzymaktivität wurde über die Bildung von Benzaldehyd aus racemischem Mandelsäurenitril bei 25 °C und pH 5.0 verfolgt. 50 µl Enzymlösung wurden mit 900 µl 50 mM Natriumcitrat-Puffer pH 5.0 gemischt und der Aktivitätstest durch Zugabe von 100 µl Substratlösung (37.5 mM Mandelsäurenitril in 10 mM Natriumcitrat-Puffer pH3.5, täglich frisch hergestellt) gestartet. Es wurde die Zunahme der Absorption bei 280 nm (Messung gegen Substratlösung ohne Enzym) 5 min lang verfolgt. 1 IU entspricht der Enzymmenge, die die Umsetzung von 1 µmol Benzaldehyd pro Minute aus Mandelsäurenitril unter den gegebenen Bedingungen katalysiert.

### Beispiel 2

#### Herstellen einer Expressions-cDNA Genbank von *Hevea brasiliensis*

mRNA wurde aus jungen Blättern eines 10 Jahre alten Baumes der Gattung *Hevea brasiliensis* aus dem botanischen Garten der Universität Graz nach Standardmethoden präpariert (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, 1990). Die Herstellung der cDNA Genbank erfolgte unter Verwendung und nach den Instruktionen der Unterlagen des "Zap-cDNA Synthesis Kit" sowie des "Gigapack II Gold Packaging Extract" (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, U.S.A.).

### Beispiel 3

Isolierung eines rekombinanten Plasmides, dessen exprimiertes Protein mit Antiserum gegen *Hevea brasiliensis* Hydroxynitrillyase immunologisch wechselwirkt

Ca. 100 000 Phagen der cDNA Genbank wurden in einem Immunscreening nach Standardmethoden unter Verwendung eines polyklonalen Anti-Hnl-Antiserums (Kaninchen) untersucht. Die Visualisierung des spezifisch gebundenen Antikörpers erfolgte mit einem auf alkalischer Phosphatase und dem chromogenen Substrat NBT (Nitroblue Tetrazolium) / X-Phosphat(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphat; 4-Toluidin Salz) basierenden Detektionssystem (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, BRD). Von einem erhaltenen positiven Klon wurde das Insert aus der Phagen-DNA nach dem Protokoll "In vivo Excision of pBluescript from Uni-Zap XR" (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, U.S.A.) in das entsprechende rekombinante Plasmid umgesetzt

(pHNL-100). Die Größe des cDNA Inserts betrug 1100 bp. pHNL-100 wurde in *E.coli* SOLR (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, U.S.A.) transformiert. Durch Induktion mit 1 mM IPTG konnte ein mit dem Anti-Hnl Antiserum immunreaktives LacZ-Hnl Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 30 - 32 kDa nachgewiesen, sowie in cytosolischen Proteinfractionen Hydroxynitrillyase Aktivität von 0,035 IU/mg Protein detektiert werden. Sämtliche molekularbiologischen Arbeitstechniken wurden aus Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1990) entnommen.

#### Beispiel 4

Sequenzierung des cDNA Fragmentes aus *Hevea brasiliensis* und Klonierung der Vollängen cDNA mit PCR-Methoden

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Kettenterminations Methode von Sanger et al. (Sanger et al., PNAS, 74:5463-5467, 1977) unter Verwendung des "DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, U.S.A.) und eines automatischen "DNA Sequencer 373A" (Applied Biosystems) durchgeführt. Aus ersten Sequenzdaten konnte ersehen werden, daß im Plasmid pHNL-100 ein unvollständiges cDNA Insert enthalten ist. Der fehlende Teil im 5'-Bereich wurde wie nachfolgend beschrieben ergänzt: Von der *H. brasiliensis* cDNA Genbank wurde Phagen-DNA isoliert und als Matrize für eine zweistufige PCR mit zwei genspezifischen Primern (Primer1: CCTCCAAGAACGTCAACAAG; Primer 2: CATCAAATGAGCCAATCTCC) und einem Vektor-spezifischen Primer (T3: AATTAACCCTCACTAAAGGG) eingesetzt. PCR Zyklus1: nur Primer 1 und 40 mg cDNA-Genbank (*H. brasiliensis*) DNA; PCR Zyklus 2: Primer 2 und T3 und 1/10 Volumen aus PCR Zyklus1 als DNA Matrize. Die erhaltene DNA aus PCR Zyklus 2 wurde mit *EcoRI* und *StyI* geschnitten und das resultierende Fragment in den entsprechenden Bereich des Plasmids pHNL-100 (*EcoRI* und *StyI* geschnitten) einkloniert. Das Insert im resultierenden Konstrukt mit der Bezeichnung pHNL-101 wurde komplett sequenziert.

Eine Analyse der DNA-Sequenz ergab einen offenen Leserahmen beginnend mit ATG bei Position 1 und endend mit einem TGA Stoppkodon bei Position 772, der für ein Protein von 29.227 Da kodiert. Die Größe dieses Proteins korreliert mit dem ermittelten Molekulargewicht der aus Blättern von *H. brasiliensis* isolierten Hydroxynitril Lyase (Hnl). Die für dieses Protein kodierende DNA-Sequenz wurde als *hnl* Gen (cDNA) von *H. brasiliensis* festgelegt.



- 7 -

## Beispiel 5

Herstellung von Hydroxynitrillyase Präparationen durch Überexpression des *H. brasiliensis hnl* Gens (cDNA) in *Escherichia coli*

Aus Gründen der Kloniertechnik wurden neue Restriktionsschnittstellen, *Nco*I im Bereich des Startkodons (Position 1) und *Hind*III nach dem Stopkodon (Position 783), unter Verwendung von Standard PCR Techniken eingeführt (Ersatz der entsprechenden Regionen durch die PCR Fragmente). Als Matrice diente in beiden Fällen DNA des Plasmides pHNL-101.

3' Bereich: PCR mit Primer P51-HX (CCGCTCGAGAAGCTTCAAAGAAGTCAATTATAG) und Primer P51-3.2 (CACGCTTCTGAGGGAAAAT), Schneiden der DNA aus der PCR mit *Xho*I und *Ce*II und einklonieren des Fragments in das Plasmid pHNL-101 (*Xho*I und *Ce*II geschnitten). Das entstandene Plasmid wurde pHNL-102 benannt.

5' Bereich: PCR mit Primer P51-EN (GGAATTCCATGGCATTTCGCTCATTTT) und Primer P51-3.1A (CCTCCAAGAACGTCAACAAG), Schneiden der DNA aus der PCR mit *Eco*RI und *Syl*I und einklonieren des Fragments in das Plasmid pHNL-102 (*Eco*RI und *Syl*I geschnitten). Das entstandene Plasmid mit der Bezeichnung pHNL-103 wurde durch Sequenzierung überprüft.

Das *Nco*I - *Hind*III Fragment aus pHNL-103 wurde im letzten Schritt in den *E.coli* Expressionsvektor pSE420 (Invitrogen Corp., San Diego, CA, U.S.A.) kloniert. Das erhaltene Plasmid pHNL-200 wurde durch Sequenzierung überprüft und in den *E.coli* Stamm Top10' (Invitrogen Corp., San Diego, CA, U.S.A.) transformiert.

Eine entsprechende Transformante wurde in 100 ml 2xYT Medium (10g/l NaCl, 10 g/l Hefe Extrakt, 16 g/l Bactotryptone), supplementiert mit 100mg/l Ampicillin-Na Salz, in einem Schikanen-Schüttelkolben bei 37 °C und 160 Upm bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> = 0.5 gezüchtet. Die Proteinproduktion wurde durch Zugabe von 1mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid) induziert und die Kultur nach Zusatz von 1% Glukose für 3 h unter den gleichen Bedingungen weitergeführt. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet und in 4ml Aufschlußpuffer (50 mM Kaliumphosphat pH 7.4, 1mM EDTA [Ethylendiamintetraacetat], 1mM PMSF [Phenylmethylsulfonylfluorid], 5% Glycerin) aufgenommen. Der Aufschluß der Zellen erfolgte unter Eiskühlung mit einem Ultraschalldesintegrator (Labsonic 2000, Fa. Braun) mit 45 Watt über 3 min. Die Aufschlußlösung wurde durch Zentrifugation für 15 min bei 27000 g und 4 °C in einem Sorvall SS-34 Rotor und einer Sorvall RC-5 Zentrifuge (DuPont Company, Wilmington, Delaware, U.S.A.) in lösliche und unlösliche Bestandteile aufgetrennt. Die lösliche Fraktion enthielt Protein mit Hydroxynitrillyase Aktivität (0.15 U/mg Protein). Eine Analyse der Proteine in den löslichen und unlöslichen Fraktionen durch SDS

- 8 -

Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western Blotting ergab, daß nur etwa 1% des gesamten produzierten heterologen immunreaktiven Hnl Proteins in der aktiven löslichen Fraktion vorlag, während 99% des immunreaktiven Hnl Proteins in der unlöslichen Fraktion in Form von nicht aktiven "Einschlußkörpern" zu finden waren.

Proteine der unlöslichen Fraktion wurden durch Zugabe von 20 ml Denaturierungspuffer (3.5 M Harnstoff, 0.1M Tris; pH 8.0) solubilisiert und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (15 min bei 27000 g bei 4 °C) entfernt. Die erhaltene Proteinlösung wurde in mehreren Stufen zuerst gegen Puffer1 (50 mM Kaliumphosphat pH 7.4, 1mM EDTA, 1M Harnstoff) und 5 mal gegen Puffer 2 (50 mM Kaliumphosphat pH 7.4, 1mM EDTA) bei 4 °C dialysiert. Die so erhaltene solubilisierte und renaturierte Proteinpräparation zeigte eine spezifische Hnl Aktivität von 0.8 bis 1.4 IU/mg Protein.

#### Beispiel 6

Herstellung von Hydroxynitrillyase Präparationen durch Überexpression des *H. brasiliensis hnl* Gens (cDNA) in *Saccharomyces cerevisiae*

Aus kloniertechnischen Gründen wurden im Bereich der *Hind*III Restriktionsschnittstelle des Plasmides pHNL-103 zwei neue Schnittstellen (*Eco*RI, *Bam*HI) durch Ligation des mit *Hind*III linearisierten Plasmides mit dem Adaptor B/E (AGCTTGAATTCGGATCC; AGCTGGATCCGAATTCA) eingeführt. Das entstandene Konstrukt mit der Bezeichnung pHNL-104 wurde durch Sequenzierung überprüft.

Das *hnl* Gen (cDNA) wurde als *Bam*HI Fragment aus dem Plasmid pHNL-104 entnommen und in den mit *Bgl*II linearisierten Hefe-Expressionsvektor pMA91 (Kingsman et al., Methods in Enzymology, 185:329-341, 1990) kloniert. Das resultierende Plasmid mit der Bezeichnung pHNL-300 wurde durch Sequenzierung überprüft und weiter in den *S. cerevisiae* Laborstamm W303 D (Hill et al., Yeast, 2:163-167, 1986) transformiert. Transformanten wurden auf Minimalmedium ohne Leucin (6.7 g/l Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids [Fa. Difco, U.S.A], 20 g/l Glukose, 20 ml/l Aminosäurekonzentrat ohne Leucin [Adenin 1.0 g/l, Methionin 1.0 g/l, Arginin 1.0 g/l, Threonin 15.0 g/l, Histidin 1.0 g/l, Tryptophan 1.0 g/l, Uracil 2.0 g/l, Lysin 11.5 g/l]) gezüchtet. Für die Proteinproduktion wurden die Zellen in einem Schikanenerlenmeyerkolben in 100 ml leucinfreiem Minimalmedium bei 30°C und 150 Upm bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> = 5.0 gezüchtet und durch Zentrifugation geerntet. Die Zellen wurden in 5 ml Aufschlußpuffer (wie bei Beispiel 5) aufgeschlämmt und nach der "Glaskugelmethode" (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1990)

in einem Merckenschlager (Fa. Braun, Melsungen, BRD) aufgeschlossen. In der löslichen cytosolischen Fraktion konnte eine Hydroxynitrillyaseaktivität von 4.62 IU/mg Protein nachgewiesen werden. Als Kontrolle dienten Hefe-Transformanten mit dem leeren Plasmid pMA91, wo keine cytosolische Hydroxynitrillyaseaktivität nachgewiesen werden konnte. Die so hergestellten wäßrigen Proteinpräparationen wurden bei -20°C gelagert. Eine weitere Möglichkeit für eine dauerhafte Lagerung der Proteinpräparation bestand darin, das Präparat nach Entfernung sämtlicher niedermolekularer Substanzen (Dialyse bei 4°C gegen destilliertes Wasser) bzw. Aufschluß der Hefezellen nach Suspension in Wasser gefrierzutrocknen (Benchtop 3L, VIRTIS Co., Inc., Gardiner, NY, U.S.A.). Die Aktivität einer in Aufschlußpuffer (wie in Beispiel 5) resolubilisierten Enzymprobe blieb dabei nahezu zu 100% erhalten.

Es war auch weiters leicht möglich, ausgehend von den wäßrigen Proteinpräparationen hochgereinigtes rekombinantes Hnl Protein herzustellen. Nach den gleichen Verfahren wie in Beispiel 1 beschrieben, konnte auf einfache Weise eine Enzympräparation, die bei SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese praktisch nur mehr eine Bande bei  $30 \pm 1$  kDa zeigt, gewonnen werden. Solche Präparationen von rekombianter, durch Überexpression in *S.cerevisiae* gewonnener Hnl zeigten spezifische Aktivität von 22 bis 28 IU/mg Protein.

#### Beispiel 7

Herstellung von Hydroxynitrillyase Präparationen durch Überexpression des *H. brasiliensis hnl* Gens (cDNA) in *Pichia pastoris*

Das *hnl* Gen (cDNA) wurde als *EcoRI* Fragment aus dem Plasmid pHNL-104 in den mit *EcoRI* linearisierten *P. pastoris* Expressionsvektor pHIL-D2 (Invitrogen Corp., San Diego, CA, U.S.A.) kloniert. Das Konstrukt mit der Bezeichnung pHNL-400 wurde durch Sequenzierung überprüft.

Die Transformation des Wirtstammes GS115 (His4-), Selektion der Histidin Prototrophen und gleichzeitig Methanol-Verwertungs Auxotrophen erfolgte nach den Unterlagen des "*Pichia* Expression Kit" Systems (Invitrogen Corp., San Diego, CA, U.S.A.). Unter 20 positiven Transformanten konnten zwei identifiziert werden, welche die Hydroxynitrillyase in hoher Konzentration intrazellulär produzierten. Die Anzucht der Zellen für die Proteinproduktion erfolgte ebenfalls nach den Protokollen des "*Pichia* Expression Kit". Die durch Zentrifugation geernteten Zellen wurden in Aufschlußpuffer (wie Beispiel 5) zu einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> = 50.0 suspendiert und nach der "Glaskugelmethode" (wie bei Beispiel 6) aufgeschlossen. In der löslichen cytosolischen Fraktion konnte Hydroxynitrillyase Aktivität von 16 U/mg Protein detektiert werden. Die so hergestellten Proteinpräparationen konnten in gleicher

Weise wie bei Beispiel 6 beschrieben ohne nennenswerte Aktivitätsverluste gelagert werden.

Nach den gleichen Verfahren wie in Beispiel 1 beschrieben, kann auf einfache Weise eine hochgereinigte Enzympräparation gewonnen werden, die bei SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese praktisch nur mehr eine Bande bei  $30 \pm 1$  kDa zeigte. Solche Präparationen von rekombinanter, durch Überexpression in *P.pastoris* gewonnener Hnl zeigten spezifische Aktivität im Bereich von 41 bis 46 IU/mg Protein.

### Beispiel 8

#### Vergleich der rekombinanten Hnl-Produkte

Gereinigte Hnl-Proteinpräparationen wurden durch isoelektrische Fokussierung mit Gelen 3-9 (Phast System, Pharmacia, Uppsala, Schweden) oder durch native Polyacrylamid Gelelektrophorese (7.5 % Polyacrylamid, Tris-Glycin Puffer pH 8.8) analysiert. Es konnte dabei festgestellt werden, daß unterschiedliche Banden bei den verschiedenen Präparationen zu finden waren.

Bei isoelektrischer Fokussierung zeigte Hnl aus *H.brasiliensis* eine Bande bei einem isoelektrischen Punkt von 4.1. Bei den rekombinanten Proteinen aus *S.cerevisiae* und *P.pastoris* konnten zwei bis drei knapp beisammenliegende Banden gefunden werden, die etwas weiter in Richtung zu basischen Bereichen entsprechenden Positionen lokalisiert waren. Bei rekombinanter Hnl aus *P.pastoris* war ein überwiegender Anteil bei diesen verschobenen Positionen zu finden.

Bei nativer Polyacrylamid Gelelektrophorese zeigten die rekombinanten Proteine aus *S.cerevisiae* und *P.pastoris* eher ähnliches Verhalten. Es konnten jeweils zwei starke eng beisammenliegende Banden, flankiert von zwei schwachen Banden als spezifisch für Hnl Protein durch Western-Blotting (mit polyklonalem anti-Hnl Antiserum) identifiziert werden. Bei Analyse des Proteins aus *H.brasiliensis* konnte im Gegensatz dazu eine etwas diffuse Bande identifiziert werden, die etwas weiter gelaufen war.

## Beispiel 9

### Identifikation von essentiellen, an der Katalyse beteiligten Aminosäuren der Hydroxynitrillyase

Recherchen in Proteindatenbanken (Swissprot, PIR, Genpept) unter Verwendung des Suchmoduls BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410, 1990) sowie die Erstellung von "multiplen Alignments" und deren statistische Analyse unter Verwendung von Programmodulen des GCG-Software Paketes (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, September 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 ) führten zu folgender Interpretation: Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* dürfte einer großen Gruppe strukturell verwandter Proteine des " $\alpha/\beta$  Hydrolase fold" Typs (Ollis et al., Protein Engineering, Vol. 5, 197-211, 1992) angehören. Neben einer charakteristischen Tertiärfaltung besitzen diese Proteine eine sogenannte katalytische Triade mit Asp od. Ser od. Cys als nukleophilen Teil der Triade sowie Asp/Glu und His. Um zu beweisen, daß diese aus Computervorhersagen ermittelten Aminosäuren auch an der katalytischen Aktivität der Hydroxynitrillyase beteiligt sind (Glu79, Ser80, Cys81, Asp207 und His235), wurden mutante Proteine der Hydroxynitrillyase mit jeweils der Aminosäure Alanin an den Positionen 79, 80, 207, 235 sowie Serin an Position 81 hergestellt. Die Mutationen wurden auf Ebene des Plasmides pHNL-104 (siehe Beispiel 6) unter Anwendung von Standard-PCR Methoden eingeführt. Für die Veränderung der Aminosäure-Positionen 79, 80, und 81 wurde jeweils ein mutanter, antisense Endprimer, der auch die für die Subklonierung notwendige, genspezifische Restriktionsschnittstelle *MunI* überlappt, und ein vektorspezifischer Primer (T3) verwendet (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1 & 2, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1990). Für die Veränderung der Aminosäure-Positionen 207 und 235 kam ein spezielles PCR-Verfahren zur Anwendung. Dabei wurden ein phosphorylierter mutanter Primer in sense Richtung, ein genspezifischer Primer, der auch die für die Subklonierung notwendige Restriktionsschnittstelle *CeII* überlappt und ein weiterer vektorspezifischer Primer (T7) verwendet (Michael S.F., BioTechniques 16, 410-412, 1994). Die Aufreinigung der PCR Produkte und Subklonierung erfolgte nach Standardmethoden. Die resultierenden mutanten *hnl* Gene (cDNA) in den Plasmiden pHNL-105 - pHNL-109 wurden in das Expressionplasmid pMA91 kloniert (pHNL-302 - pHNL-306) und die mutanten Proteine in *Saccharomyces cerevisiae*, wie unter Beispiel 6 beschrieben, produziert. In der löslichen cytosolischen Fraktion wurde die Hydroxynitrillyase Aktivität bestimmt mit dem Ergebnis, daß jede der 5 durchgeführten Mutationen zur vollständigen Inaktivierung der Enzymaktivität führte. Eine Beteiligung dieser Aminosäuren an der direkten enzymatischen

- 12 -

Katalyse kann daraus abgeleitet werden. Der globale Erhalt der Proteinstruktur bei den mutanten Proteinen im Vergleich zum nichtmutierten Protein durch nahezu gleiches Laufverhalten bei isoelektrischer Fokussierung oder nativer Polyacrylamid Gelelektrophorese verifiziert (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1 & 2, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1990).

## Ansprüche

1. (S)-Hydroxynitrillyase in gereinigter und isolierter Form.
2. (S)-Hydroxynitrillyase gemäß Anspruch 1, welche die von der folgenden DNA-Sequenz SEQ ID NO 1 abgeleitete Aminosäuresequenz SEQ ID NO 2 aufweist oder mit dieser zumindestens 80 % identisch ist.
3. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 2, die für (S)-Hydroxynitrillyase kodiert oder mit dieser Sequenz im für Hydroxynitrillyase kodierenden Bereich zu über 85 % identisch ist.
4. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 3, welche die für (S)-Hydroxynitrillyase-Aktivität notwendigen Sequenzen umfaßt.
5. Vektor, der eine DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 3 oder 4 enthält.
6. Wirtszellen enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 3 oder 4, die mittels eines Vektors eingebracht wurde.
7. Wirtszellen gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie Zellen von Mikroorganismen sind.
8. Wirtszellen gemäß Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* entstammen.
9. Rekombinantes Protein, herstellbar durch heterologe Expression einer DNA Sequenz gemäß einem der Ansprüche 3 oder 4 in einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8.
10. Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit (S)-Hydroxynitrillyase-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, daß Wirtszellen nach einem der Ansprüche 6 bis 8 kultiviert werden und das gebildete Protein isoliert wird.
11. Verwendung eines rekombinanten Proteins gemäß Anspruch 9 zur Herstellung von (S)-Cyanhydrinen.



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

|  |  |   |
|--|--|---|
| <b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b><br><b>C12N 15/60, 9/88, C12P 13/00,</b><br><b>C12N 1/19</b>   | <b>A3</b>  | <b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/03204</b><br><br><b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 30. Januar 1997 (30.01.97) |
| <b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP96/03010<br><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 10. Juli 1996 (10.07.96)<br><br><b>(30) Prioritätsdaten:</b><br>A 1182/95      12. Juli 1995 (12.07.95)      AT<br><br><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> DSM CHEMIE LINZ GMBH [AT/AT]; St. Peter-Strasse 25, A-4021 Linz (AT).<br><br><b>(72) Erfinder; und</b><br><b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> HASSLACHER, Meinhard [AT/AT]; Münzgrabenstrasse 45, A-8010 Graz (AT). SCHALL, Michael [AT/AT]; Feuerbachgasse 19, A-8020 Graz (AT). SCHWAB, Helmut [AT/AT]; Mariagrünerstrasse 93, A-8043 Graz (AT). HAYN, Elfriede, Marianne [AT/AT]; Strauchergasse 24, A-8020 Graz (AT). KOHLWEIN, Sepp [-/AT]; Camerigasse 12/42, A-8010 Graz (AT). GRIENGL, Herfried [-/AT]; Argenotstrasse 23, A-8047 Graz (AT).<br><br><b>(74) Anwalt:</b> KUNZ, Ekkehard; Agrolinz Melamin GmbH, Patentabteilung, St. Peter-Strasse 25, A-4021 Linz (AT). | <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> CA, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br><b>Veröffentlicht</b><br><i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i><br><i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i><br><br><b>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:</b> 20. März 1997 (20.03.97) |   |

**(54) Title:** (S)-HYDROXYNITRILLYASE FROM HEVEA BRASILIENSIS

**(54) Bezeichnung:** (S)-HYDROXYNITRILLYASE AUS HEVEA BRASILIENSIS

**(57) Abstract**

(S)-hydroxynitrillyase from *Hevea brasiliensis* in a purified and isolated form is disclosed, as well as the DNA sequence that codes for this enzyme, its amino acid sequence and a process for producing a protein with (S)-hydroxynitrillyase activity.

**(57) Zusammenfassung**

(S)-Hydroxynitrillyase aus *Hevea brasiliensis* in gereinigter und isolierter Form, DNA-Sequenz, die für dieses Enzym kodiert, sowie seine Aminosäuresequenz und Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit (S)-Hydroxynitrillyase-Aktivität.



### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                                |    |                                   |    |                                |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AM | Armenien                       | GB | Vereinigtes Königreich            | MX | Mexiko                         |
| AT | Österreich                     | GE | Georgien                          | NE | Niger                          |
| AU | Australien                     | GN | Guinea                            | NL | Niederlande                    |
| BB | Barbados                       | GR | Griechenland                      | NO | Norwegen                       |
| BE | Belgien                        | HU | Ungarn                            | NZ | Neuseeland                     |
| BF | Burkina Faso                   | IE | Irland                            | PL | Polen                          |
| BG | Bulgarien                      | IT | Italien                           | PT | Portugal                       |
| BJ | Benin                          | JP | Japan                             | RO | Rumänien                       |
| BR | Brasilien                      | KE | Kenya                             | RU | Russische Föderation           |
| BY | Belarus                        | KG | Kirgisistan                       | SD | Sudan                          |
| CA | Kanada                         | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden                       |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KR | Republik Korea                    | SG | Singapur                       |
| CG | Kongo                          | KZ | Kasachstan                        | SI | Slowenien                      |
| CH | Schweiz                        | LI | Liechtenstein                     | SK | Slowakei                       |
| CI | Côte d'Ivoire                  | LK | Sri Lanka                         | SN | Senegal                        |
| CM | Kamerun                        | LR | Liberia                           | SZ | Swasiland                      |
| CN | China                          | LK | Litauen                           | TD | Tschad                         |
| CS | Tschechoslowakei               | LU | Luxemburg                         | TG | Togo                           |
| CZ | Tschechische Republik          | LV | Lettland                          | TJ | Tadschikistan                  |
| DE | Deutschland                    | MC | Monaco                            | TT | Trinidad und Tobago            |
| DK | Dänemark                       | MD | Republik Moldau                   | UA | Ukraine                        |
| EE | Estland                        | MG | Madagaskar                        | UG | Uganda                         |
| ES | Spanien                        | ML | Mali                              | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| FI | Finnland                       | MN | Mongolei                          | UZ | Usbekistan                     |
| FR | Frankreich                     | MR | Mauretanien                       | VN | Vietnam                        |
| GA | Gabon                          | MW | Malawi                            |    |                                |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.  
PCT/EP 96/03010

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/60 C12N9/88 C12P13/00 C12N1/19

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X          | ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS.,<br>vol. 311, 1993,<br>pages 496-502, XP002022207<br>J. HUGHES ET AL.: "Purification,<br>characterization, and cloning of<br>alpha-hydroxynitrile lyase from cassava<br>(Manihot esculenta Crantz)"<br>see the whole document, in particular<br>figure 5 | 1,3-11                |
| X          | PHYSIOL. PLANT.,<br>vol. 75, 1989,<br>pages 97-101, XP002022208<br>D. SELMAR ET AL.: "Alpha-hydroxynitrile<br>lyase in Hevea brasiliensis and its<br>significance for rapid cyanogenesis"<br>cited in the application<br>see the whole document                                  | 1,2,11                |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 January 1997

Date of mailing of the international search report

12.02.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Yeats, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No

PCT/EP 96/03010

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | EP,A,0 539 767 (CHEMIE LINZ GMBH) 5 May 1993<br>see the whole document<br>---   | 1,2,11                |
| P,X        | J. BIOL. CHEM.,<br>vol. 271, 1996,<br>pages 5884-5891, XP002022209<br>M. HASSLACHER ET AL.: "Molecular cloning<br>of the full-length cDNA of<br>(S)-hydroxynitrile lyase from Hevea<br>brasiliensis"<br>see the whole document<br>----- | 1-11                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/03010

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP-A-539767                               | 05-05-93            | AT-B- 396252               | 26-07-93            |
|   |                     | AU-B- 656812               | 16-02-95            |
|   |                     | AU-A- 2628892              | 06-05-93            |
|   |                     | CA-A- 2078942              | 01-05-93            |
|   |                     | HR-A- 921142               | 31-12-95            |
|   |                     | JP-A- 5219988              | 31-08-93            |
|   |                     | NZ-A- 244238               | 22-12-94            |
|   |                     | SK-A- 326892               | 08-11-95            |
|   |                     | US-A- 5346816              | 13-09-94            |
|   |                     | ZA-A- 9207235              | 24-03-93            |
| -----                                     |                     |                            |                     |

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 96/03010

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 6 C12N15/60 C12N9/88 C12P13/00 C12N1/19

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|--|--------------------|
| X         | ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS.,<br>Bd. 311, 1993,<br>Seiten 496-502, XP002022207<br>J. HUGHES ET AL.: "Purification,<br>characterization, and cloning of<br>alpha-hydroxynitrile lyase from cassava<br>(Manihot esculenta Crantz)"<br>siehe das gesamte Dokument, insbesondere<br>Abb. 5. | 1,3-11             |
|           | ---  |                    |
| X         | PHYSIOL. PLANT.,<br>Bd. 75, 1989,<br>Seiten 97-101, XP002022208<br>D. SELMAR ET AL.: "Alpha-hydroxynitrile<br>lyase in Hevea brasiliensis and its<br>significance for rapid cyanogenesis"<br>in der Anmeldung erwähnt<br>siehe das gesamte Dokument.                               | 1,2,11             |
|           | ---  |                    |
|           | -/-  |                    |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Januar 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

12.02.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (- 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (- 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Yeats, S

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 96/03010

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|--|--------------------|
| X         | EP,A,0 539 767 (CHEMIE LINZ GMBH) 5.Mai 1993<br>siehe das gesamte Dokument.<br>---   | 1,2,11             |
| P,X       | J. BIOL. CHEM.,<br>Bd. 271, 1996,<br>Seiten 5884-5891, XP002022209<br>M. HASSLACHER ET AL.: "Molecular cloning<br>of the full-length cDNA of<br>(S)-hydroxynitrile lyase from Hevea<br>brasiliensis"<br>siehe das gesamte Dokument.<br>----- | 1-11               |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 96/03010

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| EP-A-539767  | 05-05-93                      | AT-B- 396252                      | 26-07-93                      |
|  |                               | AU-B- 656812                      | 16-02-95                      |
|  |                               | AU-A- 2628892                     | 06-05-93                      |
|  |                               | CA-A- 2078942                     | 01-05-93                      |
|  |                               | HR-A- 921142                      | 31-12-95                      |
|  |                               | JP-A- 5219988                     | 31-08-93                      |
|  |                               | NZ-A- 244238                      | 22-12-94                      |
|  |                               | SK-A- 326892                      | 08-11-95                      |
|  |                               | US-A- 5346816                     | 13-09-94                      |
|  |                               | ZA-A- 9207235                     | 24-03-93                      |
| -----  |                               |                                   |                               |